IC-3000 **2012 年 12 月改訂(第 5 版)
*2010 年 4 月改訂(第 4 版)

Hitachi Chemical

日立 SV1100 形マイクロチップ電気泳動装置コスモアイ用長鎖 DNA 分析キット

i - チップ LDNA

【はじめに】

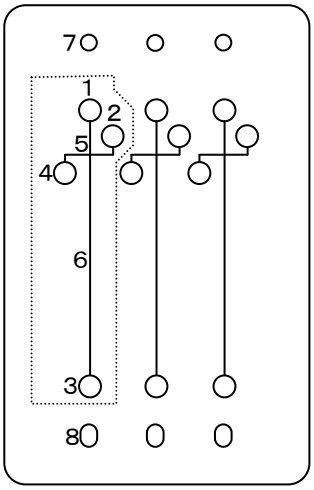
本キットは、日立 SV1100 形マイクロチップ電気泳動装置コスモアイ用の長鎖 DNA 分析キットです。従来アガロース電気泳動で行われていた 0.5ｋbp～5.0ｋbp の DNA 鎖長分析を迅速に行うことができます。

本キットは、ご使用前にこの取扱い説明書をよく読み、ご理解の上ご使用下さい。

【キットの構成】

（1）	マイクロチップ　　3 泳動レーン／チップ	20 枚
（2）	泳動ゲル	2.4mL
（3）	内部標準 DNA(0.5ｋbp、5.0ｋbp　DNA)	70μL
（4）	校正用マーカ(0.5-5.0ｋbp DNA Ladder)	20μL
（5）	ゲル充填用シリンジ	1 本

【分析方法概要】



1:**ゲルウエル1**
2:**ゲルウエル2**
3:**ゲルウエル3**
4:**試料ウエル**
5:**試料導入溝**
6:**分離泳動溝**
7:**位置決め孔(円形)**
8:**位置決め孔(俵形)**

図 1.マイクロチップ

本キットは、図 1 で示したマイクロチップを用いて電気泳動を行います。図中の点線で囲んだ範囲が一つの試料を分析するために必要な部分です。1 枚のマイクロチップで、3 つの試料を分析することができます。

図 2 に、分析法の概略を示します。先ず、ゲルウエル、試料導入溝、分離泳動溝は、泳動ゲルで満たし、試料ウエルに内部標準 DNA(0.5ｋbp と 5.0ｋbp)を添加した試料を入れます。次いで、マイクロチップを装置にセットし、泳動を開始すると、あらかじめ入力した泳動条件にしたがって泳動が自動的に行われ、分析が行われます。装置の内部では、次のように泳動が行われています。ゲルウエル 2 に電圧を印加し、試料を試料ウエルからゲル

ウエル 2 に向かって泳動させます。この泳動を、導入泳動と呼びます。導入泳動では、試料ウエルからの試料が常に試料導入溝に流れ込みますので、試料の分離は起こりません。一定時間の導入泳動の後、ゲルウエル 3 に電圧を印加し、試料導入溝と分離泳動溝の交差部にある微量の試料をゲルウエル 3 に向かって泳動します。この泳動を分離泳動と呼びます。このとき、試料ウエルとゲルウエル 2 にも電圧を印加し、試料導入溝から分離泳動溝への余分な試料の流入を防いでいます。これを戻し泳動と呼びます。試料中の DNA は、分離泳動の間に、その大きさにしたがって分離し、交差部から 3cm のところで蛍光(エチジウムブロマイド:EtBr)検出されます。得られた情報は、装置に付属のソフトウエアで解析され、泳動パターンの表示、DNA 鎖長解析、擬似ゲルイメージの表示等が行えます。

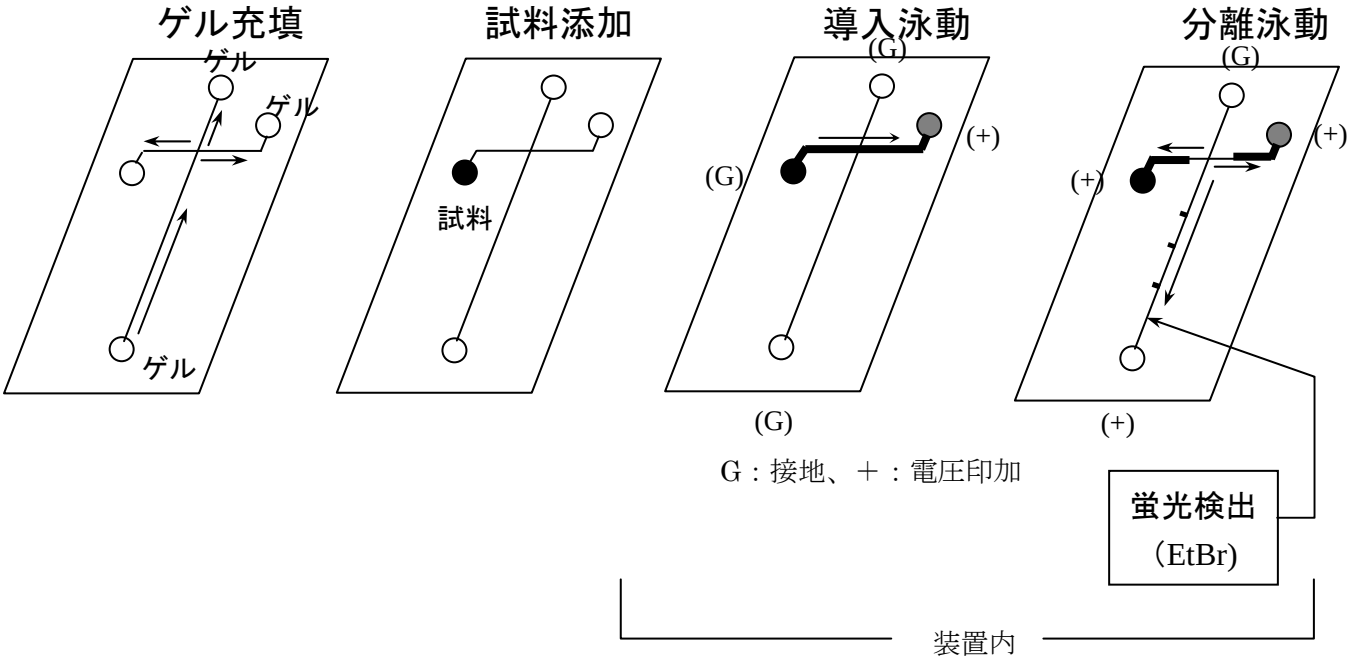


図２. 分析方法の概略

【使用方法】

(1) 必要な器具、機材

マイクロピペット　及び　チップ
プラスチックマイクロチューブ
日立 SV1100 形マイクロチップ電気泳動装置

(2) 試料の準備

①試薬キットは、使用前に室温(20～25℃)に戻してから使用して下さい。

②内部標準 DNA、校正用マーカは、ボルテックスミキサー等で攪拌した後、軽く遠心をかけ、試薬をチューブの底に集めておいて下さい。

③試料 9 μL に、内部標準 DNA 1μL を加えます。内部標準 DNA は、0.5 k bp と 5.0 k bp の DNA を含んでおり、これをもとに試料中の DNA の鎖長を計算します。
試料を希釈する場合は、TE を用いてください。希釈した試料 9μL に内部標準 DNA1μL を加えて下さい。内部標準 DNA の濃度は、この状態で 2ng/μL です。

④校正用マーカを泳動するときは、希釈等せず、そのまま用います。

⑤内部標準 DNA、校正用マーカ、泳動ゲル中には、エチジウムブロマイドが添加してありますので、試料に改めてエチジウムブロマイドを添加する必要はありません。

(3) 泳動ゲル充填方法

①ゲルウエル 3 に、10μL の泳動ゲルを入れます。

②ゲル充填用シリンジに空気を入れ、シリンジ先端のゴムをゲルウエル 3 を覆うように押し当て、シリンジのピストンを軽く押して圧をかけ、ゲルを充填します。ゲルが分離泳動溝を上昇し、交差部に達し、その後三方向に充填されていくのが観察されます。

③ゲルがゲルウエル 1、2 及び試料ウエルに達した後、さらに 10 秒ほど圧をかけます。

④ゲルウエル 1 及び 2 に泳動ゲル 10μL を入れます。

(4) 試料の添加

(2) で準備した試料 8～10μL、または、校正用マーカ 8μL を試料ウエルに入れます。

(5) 装置へのセット

装置の蓋を開け、測定するレーンの位置決め孔 7(円形)を装置の左のガイドピンに入れ、位置決め孔 8(俵形)を右のガイドピンに入れ、装置蓋を閉めます。

(6) 測定

①装置取扱い説明書に従い、導入泳動電圧・時間、分離泳動電圧・時間を入力し、測定開始ボタンをクリックすると泳動を開始し、データを取り込みます。
長鎖 DNA 分析の標準的な泳動パラメータは、導入電圧 300V、時間 1 分、分離泳動電圧 400V、時間 4 分、戻し泳動電圧 75V です。

②装置の取扱い説明書に従い、データの解析を行って下さい。

【廃棄方法】

使用後のマイクロチップ、余った試薬、試薬分注に用いたピペットチップは、アフターバーナーおよびスクラバーを備えた焼却炉で焼却処分して下さい。

【使用上または取扱い上の注意】

1.安全衛生に関する注意

(1) 本キットの泳動ゲル、内部標準 DNA、校正用マーカは、変異原性のある物質(エチジウムブロマイド)を含有していますので、取扱いの際には、手袋、保護メガネ、マスク等の保護具を着用して下さい。万一、皮膚等に付着した場合は、水で充分洗い流して下さい。

(2) 本キットの内部標準 DNA、校正用マーカは、アジ化ナトリウムを含有(0.09%)しています。アジ化ナトリウムを 0.1%より多く含む試薬は、毒物としての規制を受けますが、本キットの試薬はこの濃度以下ですので、毒物として管理する必要はありません。アジ化ナトリウムは鉛または銅と反応し爆発性のアジ化金属を生成することがありますので、これらの金属と接触しないようご注意下さい。

2.分析に際しての注意

(1) 使用期限切れの試薬は使用しないで下さい。

(2) 試薬は室温(20～25℃)に戻してから使用し、直射日光は避けて下さい。また、使用後は速やかに冷蔵庫に戻してください。

(3) マイクロチップのウエルに入れた泳動ゲル、試料等が乾燥しないよう、泳動ゲルの充填・試料の添加後、速やかに泳動を行って下さい。

(4) マイクロチップの試料導入溝と分離泳動溝の交差部から 3cm の位置で、分離泳動溝

の蛍光を検出しています。この近辺を汚したり、傷つけたりしないで下さい。
(5) 測定終了後、または、電極に汚れが認められたときは、装置の取扱説明書に従って電極の清掃を行ってください。
(6) ゲルウエル、サンプルウエルに気泡が存在すると、サンプル導入不良によるピーク高さの低下、分離能の低下等の異常が起こることがあります。ゲル分注、サンプル分注の際は、ウエルに気泡が入らないようご注意下さい。
(7) ゲル充填の不足、気泡の混入などにより、規定の時間内に泳動･検出されるべきピークが観察されない場合があります(内部標準 DNA の高分子側のピークが出ない等)。このような場合は、別のレーンを用いて分析し直してください。

3.その他の注意事項
(1) 本キットは、研究用試薬キットです。ヒト、動物の医療、診断用途には使用しないで下さい。
(2)本キットは日立 SV1100 形マイクロチップ電気泳動装置専用に開発されたものです。これ以外の装置を用いたときの不具合、異常についての保証はいたしかねます。
**(3) 本取扱い説明書の記載内容は、2013 年 1 月現在のものです。製品の仕様・外観を予告なしに変更することがありますのでご了承下さい。
(4) 本キットを使用した分析が、第三者の所有する工業所有権に抵触しないことを保証するものではありません。

【貯法、使用期限】
2～10℃
使用期限は外箱に記載

【包装単位】
1 キット（60 テスト分）

**【問い合せ先】
日立化成株式会社　学術担当
〒100-6606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号
TEL (03)5533-6910 (ダイヤルイン)
FAX (03)5533-6995

**【製造元】
◎日立化成株式会社
〒100-6606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号
TEL (03)5533-6910 (ダイヤルイン)

IC-3000-1212E　Printed in Japan